甲基苯丙胺成瘾患者的尿液蛋白质组学研究

沈梓芸[1]，梁军成[2]，汤抒璇[1]，潘宣圳[1]，鲍艺今[1]，邓艳萍[2]*，高友鹤[1]*

1. 北京师范大学生命科学学院基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100875
2. 北京大学中国药物依赖性研究所 北京 100191

摘要：药物成瘾是一种严重的慢性复发性脑病，甲基苯丙胺成瘾病程复杂，难以治疗，造成严重的公共卫生负担。本研究对比分析了甲基苯丙胺成瘾急性戒断期患者（停止使用24小时以内）、甲基苯丙胺戒断康复期患者（停止使用3个月以上）、健康志愿者的尿液蛋白质组，甲基苯丙胺成瘾患者（甲基苯丙胺急性戒断期、甲基苯丙胺戒断康复期患者）的尿液蛋白质组与健康人之间显著不同，部分差异蛋白及其富集到的生物学功能，显示与成瘾或甲基苯丙胺的神经毒性有关，可能是药物成瘾的潜在的干预靶点；甲基苯丙胺戒断康复期患者仍难以恢复到正常人的水平，可能用于揭示甲基苯丙胺复吸率高的原因。本研究建立了一个从尿液蛋白质组学角度研究成瘾性药物的方法，证明了尿液蛋白质组能够相对系统、全面地反映甲基苯丙胺滥用对机体产生的影响，为临床成瘾性疾病的研究和实践提供线索。

关键词：尿液；蛋白质组；甲基苯丙胺；成瘾；物质使用障碍；药物成瘾

Urine Proteomics in Methamphetamine Addicted Patients

Ziyun Shen[1], Juncheng Liang[2], Shuxuan Tang[1], Xuanzhen Pan[1], Yijin Bao[1], Yanping Deng[2]*, Youhe Gao[1]*

1. Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China
2. National Institute of Drug Dependence, Peking University, Beijing, 100191, China

ABSTRACT: Drug addiction is a serious chronic relapsing brain disease, and methamphetamine dependence has a complex course and is difficult to treat, causing a serious public health burden. In this study, we compared and analyzed the urine proteome of methamphetamine-using patients (patients who stopped using methamphetamine within 24 hours), methamphetamine-withdrawing patients (patients who stopped using drugs for more than 3 months and entered rehabilitation treatment), healthy individuals. The urine proteome of methamphetamine-addicted patients (including patients who were using methamphetamine and methamphetamine-withdrawing patients) was significantly different from that of healthy individuals, and some differential proteins and their enriched biological functions showed that they were associated with addiction or neurotoxicity of methamphetamine and may be potential intervention targets for drug addiction. Patients who withdrew methamphetamine for more than 3 months were still difficult to return to normal levels and may be used to reveal the reasons for the high rate of methamphetamine relapse. In this study, a method of studying addictive drugs from the perspective of urine proteomics was established, which proved that urine proteome can reflect the effects of methamphetamine abuse

---

基金项目：北京师范大学（11100704）

* 通讯作者（Corresponding author）：高友鹤，男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物. Tel: 010-58804382；E-mail：gaoyouhe@bnu.edu.cn.

* 共通讯作者（Corresponding author）：邓艳萍，女，教授，主要研究方向为临床药理学和药代动力学，Tel: 010-82801340；E-mail：deng311@bjmu.edu.cn.

on the body relatively systematically and comprehensively, and has the potential to provide clues for the study and practice of clinical addictive diseases.
Keywords: urine; proteomic; methamphetamine; addiction; substance use disorder; drug abuse

1 引言

药物成瘾是全球性的、重大的公共卫生和社会问题。《2021 世界毒品报告》显示，2020 年，全世界约有 2.84 亿 15-64 岁的人使用毒品，比过去十年增长了 22%。药物成瘾严重危害用药者躯体和心理健康的同时，成瘾人群的持续增长更给社会带来巨大的卫生、经济和治安等方面的负担。目前《国际禁毒公约》将成瘾性药物分为 3 类：①麻醉药品，包括阿片类、可卡因类和大麻类等；②精神药品，包括镇静催眠药、中枢兴奋剂和致幻剂等；③其他，包括烟草、酒精和挥发性有机溶剂等[1]。

甲基苯丙胺（Methamphetamine，METH）甲基苯丙胺，又名“冰毒”，是一种强烈的成瘾性药物，在世界范围都造成了严重的社会和健康问题。我国现有吸毒人员近 150 万名，其中滥用冰毒者近 80 万名，冰毒已取代海洛因成为我国滥用人数最多的毒品[2]。长期滥用甲基苯丙胺会造成严重的身体和精神伤害。甲基苯丙胺具有高亲脂性[3]，与其他精神兴奋剂相比，甲基苯丙胺更易进入中枢神经系统（CNS），并且分布在整个大脑，作用持续时间更长，因此甲基苯丙胺更容易上瘾[4]。甲基苯丙胺会诱导产生长期神经毒性，对中枢神经系统的损害十分严重和持久[5]。冰毒成瘾者经常遭受长期性精神障碍和认知能力下降[6]。神经毒性和兴奋性毒性的神经化学机制很复杂，尚不清楚。

研究表明，甲基苯丙胺成瘾涉及多个神经递质系统和神经环路的变化。甲基苯丙胺的化学结构与单胺相似[7]。在大脑中，甲基苯丙胺作用于多巴胺、5-羟色胺、去甲肾上腺素和肾上腺素等神经递质系统，导致神经递质的释放和再摄取的改变，从而产生强烈的欣快感和成瘾行为[8]。甲基苯丙胺作用的最终结果是过度刺激中枢和周围神经系统的单胺能通路，导致纹状体、前额叶皮层和海马体等多个脑区出现严重功能障碍甚至神经元变性，进一步加剧成瘾行为的形成和维持[7]。甲基苯丙胺依赖这一疾病病程复杂，难以治疗，造成严重的公共卫生负担[9]。

药物成瘾是一种严重的慢性复发性脑疾病,涉及奖赏、动机、学习记忆和决策等高级神经活动,其机制非常复杂,涉及多个脑区、环路以及系统的参与。目前药物成瘾的机制尚未完全阐明，给成瘾的预防和治疗带来较大困难，因此，了解药物成瘾对机体的影响以及寻找相关的生物标志物对于制定有效的干预和治疗策略具有重要意义。

药物成瘾是一个动态的行为和生理过程。代谢组学技术、蛋白质组学技术被广泛应用于成瘾性物质的研究。蛋白质组学是一种研究蛋白质在生物体内表达和功能的全局性方法，目前运用蛋白质组学技术能够分析药物成瘾时蛋白质的表达和改变。蛋白质组学技术已被广泛用于研究多种成瘾性物质对动物模型和人类的影响，例如，研究人员利用蛋白质组学技术对甲基苯丙胺成瘾患者的血浆进行分析[10]，或是评估酒精、安非他明、甲基苯丙胺、可卡因、大麻、吗啡、尼古丁等成瘾药物暴露的动物和人类脑组织中的蛋白质表达[11]，为进一步研究成瘾相关的生物化学通路、基因、蛋白质提供了丰富的资源。但是至今为止少有研究者运用尿液蛋白质组学技术研究药物成瘾。

尿液中的蛋白质包含丰富的信息,可以反映出机体不同系统、不同器官产生的微小变化。与其他体液样本相比，尿液不受稳态机制的影响，能够积累机体生理状态的早期变化，具有高灵敏度的指示作用，有潜力辅助疾病的早期诊断、治疗和预后监测。此外，得益于非侵入性的收集方式，尿液可以被连续、大量、重复收集并便捷、稳定地保存，且组分相对简单，易于分析。这使得尿液成为检测疾病生物标志物的理想样本[12]。

诸多动物模型和临床样本研究说明，尿液蛋白质组学研究能为神经退行性疾病等脑部疾病的早期诊断和干预提供线索[13]。Zhang 等人鉴定阿尔兹海默症小鼠的尿蛋白质组，发现在病理显示β-淀粉样蛋白沉积之前，尿液中已经出现了阿尔兹海默症相关的生物标志物[14]；Song 等人发现，在检测到淀粉样蛋白斑块沉积之前，5XFAD 小鼠模型的尿外泌体蛋白质表现出阿尔茨海默症相关的差异[15]。Matthias Mann 研究团队将蛋白质组学技术、遗传筛查与机器学习相结合，尿液蛋白质组可以将携带不同帕金森病相关突变基因、不同疾病表现的人区分开，可以被应用于家族性帕金森病的分层[16]。

此外，尿液蛋白质组学研究对精神障碍和行为障碍等疾病有所涉及。Meng 等人发现，筛选出的尿蛋白质生物标志物组可以有效区分不同年龄组的健康儿童和自闭症儿童，有潜力辅助自闭症的早期诊断和干预，并且运用随机分组方法验证结果的可信度[17]。Wang 等人发现，自闭症患者蛋白质组显示出与疾病机制有关的生物学通路变化[18]。Huan 等人检测了对于抗抑郁药物有不同反应的重度抑郁症患者的差异表达蛋白质，尿液生物标志物有潜力预测重度抑郁症患者的有效治疗措施，为精准化治疗提供线索和依据，提高患者的生活质量[19]。

目前还没有涉及甲基苯丙胺等成瘾性药物的尿液蛋白质组研究结果被发表。鉴于尿液蛋白质组可以反映出多种脑疾病导致的变化，本研究希望能拓宽尿液蛋白质组的应用潜力，将其应用于药物成瘾这一复杂、难治的脑疾病。

本研究旨在探究甲基苯丙胺成瘾患者尿液蛋白质组与健康人的不同，从生物学通路、人群行为特征等不同层次进行系统解析，以期揭示甲基苯丙胺成瘾对机体生理状态的影响，寻找潜在的与甲基苯丙胺成瘾相关的蛋白生物标志物和甲基苯丙胺成瘾治疗的候选药物靶点，从而为药物成瘾的诊断和治疗提供新的线索，同时为药物成瘾的研究提供全新视角。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验耗材

1.5ml/2ml 离心管（美国 Axygen 公司）、50ml/15ml 离心管（美国 Corning 公司）、96 孔细胞培养板（美国 Corning 公司）、10kD 滤器（美国 Pall 公司）、Oasis HLB 固相萃取柱（美国 Waters 公司）、1ml/200ul/20ul 移液枪头（美国 Axygen 公司）、BCA 试剂盒（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、高 pH 反向肽分离试剂盒（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、iRT (indexed retention time, 英国 BioGnosis 公司)。

2.1.2 实验仪器

冷冻高速离心机（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、真空浓缩仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、DK-S22 电热恒温水浴锅（上海精宏实验设备有限公司）、全波长多功能酶标仪（德国 BMG Labtech 公司）、振荡器（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、TS100 恒温混匀仪（杭州瑞诚仪器有限公司）、电子天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司）、-80℃超低温冷冻冰箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、EASY-nLC1200 超高效液相色谱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、Orbitrap Fusion Lumos Tribird 质谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

2.1.3 实验试剂

使用了胰酶 Trypsin Golden（美国 Promega 公司）、二硫苏糖醇 DTT（德国 Sigma 公司）、碘乙酰胺 IAA（德国 Sigma 公司）、纯净水（中国娃哈哈公司）、质谱级甲醇（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、质谱级乙腈（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、质谱级纯水（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、Tris-Base（美国 Promega 公司）等试剂。

2.1.4 分析软件

Proteome Discoverer(Version2.1，美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、Spectronaut

Pulsar（英国 Biognosys 公司）、Ingenuity Pathway Analysis（德国 Qiagen 公司）；R studio（Version1.2.5001）；Xftp 7；Xshell 7。

2.2 实验方法

2.2.1 研究对象选取与设计

受试者被分为 3 组：第一组是急性期组，即急性停止使用甲基苯丙胺 24 小时以内、入院治疗的患者，记为 A；第二组是康复期组，即停止使用毒品 3 个月以上的、进入康复期治疗的患者，记为 R；第三组是对照组，即健康志愿者，记为 H。与医院和研究所合作，收集尿液样本，收集的尿液样本暂存在-80℃冰箱备用。共收集到急性期患者尿液样本 22 例、康复期患者样本 26 例、健康人尿液样本 28 例。部分样本的肽段含量较低，或体检显示有其他疾病，被排除。最终纳入分析的有急性期患者尿液样本 19 例、康复期患者尿液样本 22 例、健康人尿液样本 25 例。本研究经北京大学医学部伦理委员审核批准，所有受试者均签署知情同意书。

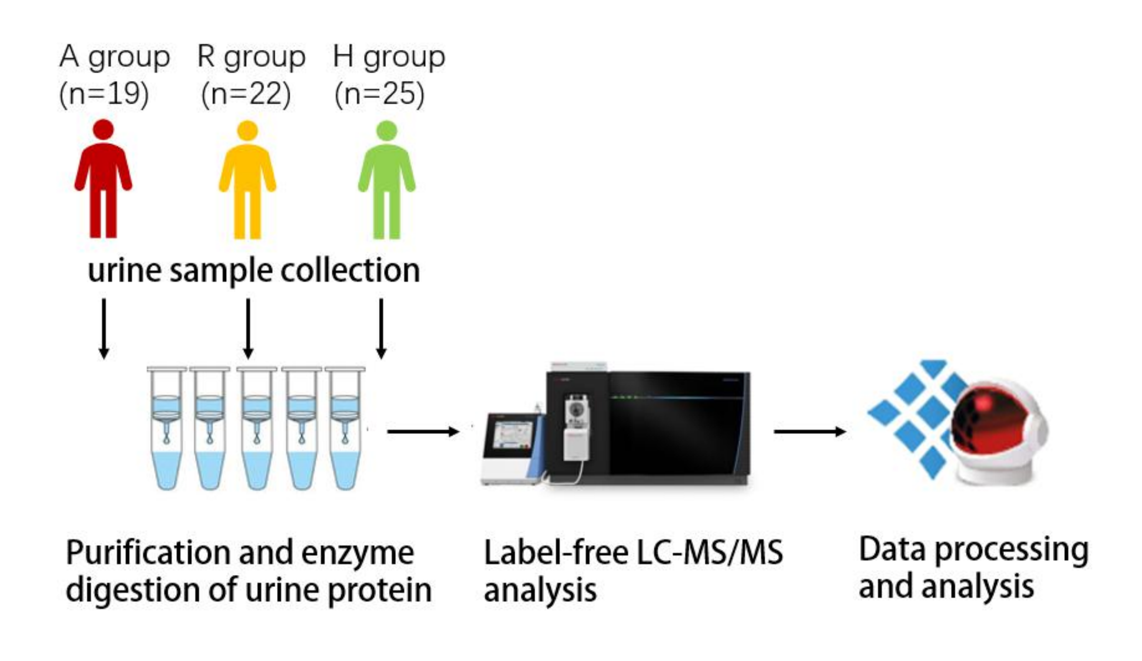


图 1 研究方法与技术路线

2.2.2 尿液样本处理

取出 2ml 尿样解冻，4℃，12000×g 条件下离心 30 分钟，去除细胞碎片，取上清液加入 1M 二硫苏糖醇（Dithiothreitol, DTT, Sigma）贮液 40ul，达到 DTT 的工作浓度 20mM，混匀后金属浴 37℃加热 60 分钟，晾凉至室温后，加入碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma）贮液 100ul，达到 IAM 的工作浓度，混匀后常温避光反应 45 分钟。反应结束后，将样本转移至新的离心管中，与三倍体积的预冷无水乙醇充分混合，置于-20℃冰箱中 24 小时沉淀蛋白。沉淀结束，4℃，10000×g 条件下离心 30 分钟，弃去上清，干燥蛋白沉淀，向蛋白沉淀中加入 200ul 20mM Tris 溶液复溶。复溶后的样品离心后保留上清液，采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。使用滤器辅助样品制备（FASP）的方法，将尿蛋白提取液加入 10kD 超滤管（Pall, Port Washington, NY, USA）的滤膜上，分别加入 20mM Tris 溶液洗涤三次，加入 30mM Tris 溶液重溶蛋白，每个样品按比例（尿蛋白：胰酶=50：1）加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Mass Spec Grade, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行消化，37℃孵育 16 小时，酶解后的滤液即为多肽混合液。收集到的多肽混合液通过 Oasis HLB 固相萃取柱进行除盐处理后真空干燥，置于-80℃保存。加入 30 微升 0.1%甲酸水将冻干多肽粉末复溶后，使用 BCA

试剂盒对肽段浓度进行测定，将肽段浓度稀释至0.5μg/μL，每个样本取出4微升作为mix样本。

2.2.3 LC-MS/MS串联质谱分析

所有鉴定样品以样品：iRT为20：1 的体积比例加入稀释100倍的iRT标准液，统一保留时间。对所有样本进行数据非依赖性采集（DIA），每个样本重复2次，每隔10针插入1针mix样本作为质量控制。将1ug样本使用EASY-nLC1200液相色谱分离(洗脱时间:90min，梯度:流动相A:0.1%甲酸、流动相B:80%乙腈),洗脱下来的肽段进入Orbitrap Fusion Lumos Tribird质谱仪分析，生成样品对应的raw文件。

2.2.4数据处理和分析

将DIA模式下采集的raw文件导入Spectronaut软件分析，高度可信蛋白标准为肽段q value<0.01，应用峰面积定量法对二级肽段所有碎片离子峰面积进行蛋白定量，自动归一化处理。

保留含有两个或以上特异肽段的蛋白，将缺失值替换成0，计算各个样本鉴定到的不同蛋白含量，将不同样本进行比较，按照FC≥1.5&≤0.67，P＜0.05的筛选条件筛选差异蛋白。

利用悟空平台(https://omicsolution.org/wkomics/main/)进行非监督聚类分析(HCA)、主成分分析（PCA）、OPLS-DA分析。使用DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行差异蛋白功能富集分析，得到生物学过程、细胞定位和分子功能3个方面的结果。并且对差异蛋白进行Ingenuity Pathway Analysis（IPA）分析。基于Pubmed数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/）对差异蛋白和相关通路进行搜索。使用STRING数据库进行蛋白互作网络分析（https://cn.string-db.org/）。

3 结果与讨论

3.1 样本基本情况

我们采用数据非依赖性采集模式下非标记定量技术对19例急性期患者样本、22例康复期患者样本、25例健康志愿者样本进行质谱鉴定，总共鉴定到2917个高度可信尿蛋白（unique peptides≥2， FDR＜1%）。

表1 样本的鉴定情况

Class	A group	R group	H group	Total
Number of samples	19	22	25	66
Age(Years)	34±5	33±7	31±5	32±6
Average of protein groups	2057±335	2013±268	2052±303	2040±302

3.2 急性组与健康组比较分析

3.2.1 差异蛋白分析

健康组与急性期患者组的对比分析中，筛选出143个差异蛋白，筛选条件是FC＞1.5或＜0.67，P＜0.05。

其中有6个差异蛋白FC为0，呈现从有到无的变化，即在所有甲基苯丙胺成瘾患者的尿液中检测值为0，在几名健康人的尿液中有检测到。

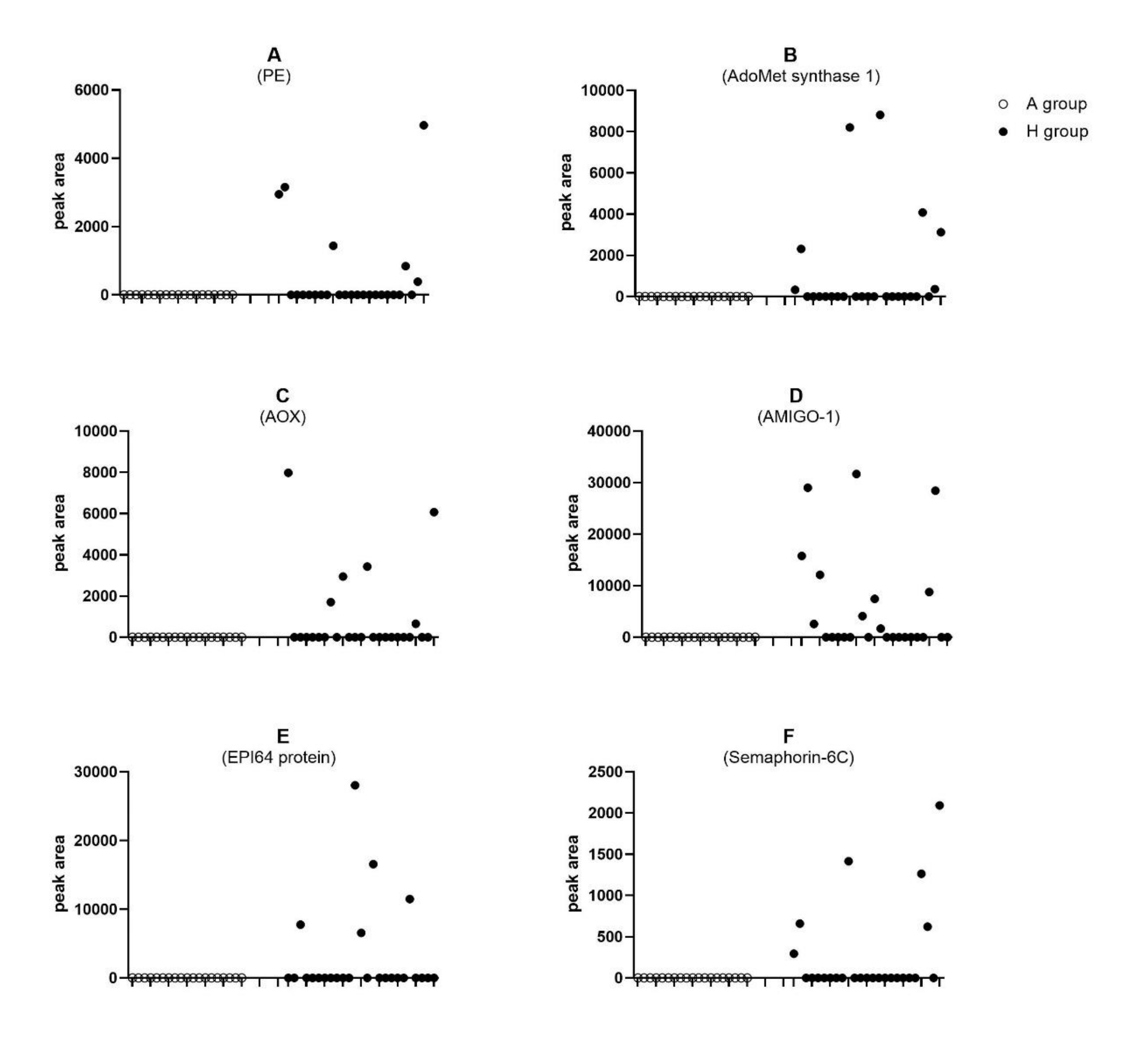


图 2 在甲基苯丙胺患者和健康人比较中变化倍数（FC）为 0 的蛋白质（p＜0.05）

3.2.2 差异蛋白的 IPA 通路分析

差异蛋白富集到 38 个 IPA 通路，许多通路与精神疾病、药物成瘾密切相关。

表 2 急性期患者与健康人之间差异蛋白富集到的 IPA 通路

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Related to drug abuse
L-carnitine Biosynthesis	3.87	[20]
Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	3.58	[23, 22, 21]
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	3.11	[25, 24]
Role of JAK family kinases in IL-6-type Cytokine Signaling	2.74	[28, 27, 26]
Xenobiotic Metabolism AHR Signaling Pathway	2.7	
Role Of Chondrocytes In Rheumatoid Arthritis Signaling Pathway	2.59	[25, 24]
Histamine Degradation	2.48	[30, 29]
Role Of Osteoclasts In Rheumatoid Arthritis Signaling Pathway	2.44	[25, 24]
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	2.41	[32, 31]
Fatty Acid α-oxidation	2.3	[34,33,32]
Putrescine Degradation III	2.24	
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	2.16	[35]

Ethanol Degradation IV	2.1	
Acute Phase Response Signaling	2.09	
LXR/RXR Activation	2.02	[32]
PI3K/AKT Signaling	1.96	[36]
Dopamine Degradation	1.95	[8]
STAT3 Pathway	1.88	[28]
Ethanol Degradation II	1.82	[37]
Noradrenaline and Adrenaline Degradation	1.76	[23,8]
Oxidative Ethanol Degradation III	1.76	[37]
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1.76	
Ascorbate Recycling (Cytosolic)	1.7	[38]
D-glucuronate Degradation I	1.7	
S-adenosyl-L-methionine Biosynthesis	1.7	[39]
N-acetylglucosamine Degradation I	1.7	
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	1.68	[25,24]
Retinoate Biosynthesis I	1.68	[32]
Retinoate Biosynthesis II	1.58	[32]
Pentose Phosphate Pathway (Oxidative Branch)	1.58	[40]
Catecholamine Biosynthesis	1.58	[23]
Trans, trans-farnesyl Diphosphate Biosynthesis	1.58	
N-acetylglucosamine Degradation II	1.58	
Serotonin and Melatonin Biosynthesis	1.48	[8]
Glutathione Redox Reactions II	1.48	[41]
Rapoport-Luebering Glycolytic Shunt	1.48	[40]
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	1.4	[42]

富集到的 IPA 通路中包括许多重要神经递质及其前体、衍生物、神经调质等物质的代谢过程，例如，左旋肉碱生物合成、色氨酸降解、组胺降解、脂肪酸α-氧化、腐胺降解、THOP1 在阿尔茨海默病中的神经保护作用、多巴胺降解、乙醇降解、去甲肾上腺素和肾上腺素降解、芳烃受体信号传导、抗坏血酸再循环、S-腺苷-L-蛋氨酸（S-adenosyl-L-methionine, SAM）生物合成、维甲酸（Retinoate）生物合成、儿茶酚胺生物合成、血清素和褪黑素的生物合成、谷胱甘肽氧化还原反应等。

左旋肉碱生物合成是 p 值最小（显著性最大）的通路。左旋肉碱是一种促使脂肪转化为能量的类氨基酸。长期服用甲基苯丙胺、阿片类毒品会导致食欲消退、身体消瘦，笔者认为这可能与左旋肉碱代谢有关。左旋肉碱可能能够通过在多巴胺释放或线粒体功能水平上的作用来发挥其对甲基苯丙胺毒性的神经保护作用[20]。

三个差异蛋白富集到色氨酸降解。色氨酸代谢物是 5-羟色胺、褪黑激素、犬尿氨酸和喹啉通路的胺前体，其水平已被发现受甲基苯丙胺成瘾的影响[21]。犬尿氨酸途径是色氨酸降解的主要途径，研究发现在某些阶段调节犬尿氨酸代谢可以减少、预防或消除类似药物的寻求行为[22]。

根据文献，甲基苯丙胺的作用机制是去甲肾上腺素等儿茶酚胺类神经递质释放增加[23]。多巴胺、血清素是在成瘾过程中发挥重要作用的神经递质。成瘾性药物会引发下丘脑、纹状体等部位内组胺水平的变化，组胺在药物成瘾过程中具有重要作用[30,29]。

四个差异蛋白富集到THOP1在阿尔茨海默病中的神经保护作用，z-score为-1。THOP1（thimet oligopeptidase 1）是一种酶，主要功能是降解神经肽和激素，如催产素和血管紧张素Ⅱ等，THOP1在中枢神经系统的神经调节和免疫系统的调节中发挥了重要的作用，与阿尔茨海默病等许多疾病的发展和预后密切相关。甲基苯丙胺滥用可能导致阿尔茨海默病和神经退行性变的过早发展[35]。

L-抗坏血酸通过抑制氧化应激、自噬和细胞凋亡来防止甲基苯丙胺诱导的皮质细胞神经毒性[38]。可卡因显著降低了背纹状体中的S-腺苷-L-蛋氨酸（SAM）/S-腺苷-L-同型半胱氨酸（SAH）比值水平[39]。长期甲基苯丙胺自我给药可增加中脑边缘线粒体耗氧量并减少纹状体谷胱甘肽[41]。

若干蛋白质富集到成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞在类风湿关节炎中的作用。甲基苯丙胺导致中枢神经系统多巴胺的增加。多巴胺能系统强烈影响类风湿性关节炎的进展[24]。多巴胺可能参与骨形成、类风湿性关节炎的骨重塑和关节侵蚀[25]。

富集到的IPA通路中还包含一些信号转导通路，如，JAK家族激酶在IL-6型细胞因子信号传导中的作用、异种代谢AHR信号通路、LPS/IL-1介导的RXR功能抑制、急性期反应信号、LXR/RXR激活、PI3K / AKT信号、STAT3通路等。

四个差异蛋白富集到JAK家族激酶在IL-6型细胞因子信号传导中的作用，z-score为-2。另外，四个差异蛋白富集到STAT3通路。长期甲基苯丙胺使用者血清TNF-α、IL-6和IL-18水平升高[27,26]。还有研究表明，TNF-α和IL-6通过IL-6受体对甲基苯丙胺诱导的小胶质细胞死亡具有保护作用，特别是通过激活JAK-STAT3通路，从而改变促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白[28]。

四个差异蛋白富集到异种代谢AHR信号通路和芳烃受体信号传导。芳烃受体（aryl hydrocarbon receptor，AHR）能够识别一些异源物质和天然化合物，例如色氨酸代谢产物。

六个差异蛋白富集到LPS/IL-1介导的RXR功能抑制。研究表明，暴露于甲基苯丙胺的小鼠海马组织中IL-1β的蛋白质水平显着增加[31]。类视黄醇X受体（RXR）参与苯丙胺诱导的运动活动[32]。

五个差异蛋白富集到PI3K/AKT信号。甲基苯丙胺可以通过激活多巴胺/PI3K/AKT信号通路来介导神经保护[36]。

四个差异蛋白富集到肝纤维化/肝星状细胞活化。腹腔注射甲基苯丙胺的大鼠血清中丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶活性水平较对照组显著升高，提示肝损伤明显[42]。

糖酵解相关通路、脂肪酸氧化也被富集到。甲基苯丙胺会引起碳水化合物代谢改变[40]。甲基苯丙胺抑制人类神经元和星形胶质细胞对葡萄糖的摄取，在葡萄糖限制期间这些细胞会适应性地将脂肪酸氧化作为替代能量来源[33]。甲基苯丙胺可通过多个靶点引起星形胶质细胞的结构变化，其中细胞结构、类固醇生物合成和脂肪酸生物合成可能在神经损伤中发挥重要作用[43]。苯丙胺通过内源性儿茶酚胺的释放发挥脂肪动员作用[34]。

3.2.3 差异蛋白的GO分析和KEGG通路分析

利用DAVID数据库对差异蛋白进行功能分析，共富集到26个生物学过程（BP），包括基因沉默的调控、基因表达的调控，表观遗传学、端粒组织、DNA复制依赖性核小体组装、核小体组装、内肽酶活性的负调节、细胞粘附、突触前组装的调节、骨矿化、前列腺素代谢过程、突触组装的积极调节、神经元死亡的负调节、蛋白质代谢过程的正向调节、细胞-基质粘附的正向调节、记忆、肉碱生物合成工艺、涉及生殖的发育过程、破骨细胞增生、蛋白水解、病毒进入宿主细胞、血管生成、调节蛋白质定位到膜、神经嵴细胞迁移等。

十个差异蛋白富集到基因沉默的调控、基因表达的调控(表观遗传)、端粒组织、DNA复制依赖性核小体组装、核小体组装等生物学过程。DNA甲基化主要通过在基因启动子区域的

胞嘧啶上添加甲基，阻碍转录因子的结合，从而长时程抑制基因表达，可能是成瘾行为长期存在的关键分子机制[44]。

三个差异蛋白富集到前列腺素代谢过程。研究表明前列腺素是以积极或消极方式调节脑部疾病进程的药物。前列腺素（PG） 是在生理和病理条件下通过花生四烯酸的连续氧化形成的。对于 PGs 的产生，环氧合酶是一种必需的酶，具有两种亚型，分别命名为环氧合酶-1（COX-1）和环氧合酶-2（COX-2）[41]。环氧合酶-2 是甲基苯丙胺诱导的神经毒性的必要因素[45]。大麻患者的血清代谢组中被发现拥有比对照组更高的前列腺素 F1a[46]。

六个差异蛋白富集到血管生成。甲基苯丙胺给药可诱导视网膜缺氧和血管生成[47]。

若干个差异蛋白富集到突触的调节、神经元死亡的调节、记忆、神经嵴细胞迁移等生物学过程。

表 3 急性期患者与健康人之间的差异蛋白富集到的生物学过程（BP）

Term	Count	%	P-Value
regulation of gene silencing	10	6.6	3E-18
regulation of gene expression, epigenetic	10	6.6	1.5E-13
telomere organization	10	6.6	2.3E-13
DNA replication-dependent nucleosome assembly	10	6.6	1.3E-12
nucleosome assembly	10	6.6	2.2E-06
negative regulation of endopeptidase activity	7	4.6	0.00079
cell adhesion	13	8.6	0.00093
regulation of presynapse assembly	4	2.6	0.0024
heterophilic cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	4	2.6	0.0069
bone mineralization	4	2.6	0.0076
prostaglandin metabolic process	3	2	0.011
positive regulation of synapse assembly	4	2.6	0.011
negative regulation of neuron death	4	2.6	0.012
positive regulation of protein metabolic process	3	2	0.014
positive regulation of cell-matrix adhesion	3	2	0.018
memory	4	2.6	0.028
carnitine biosynthetic process	2	1.3	0.029
cell-substrate junction assembly	2	1.3	0.037
developmental process involved in reproduction	2	1.3	0.037
osteoclast proliferation	2	1.3	0.037
proteolysis	8	5.3	0.037
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	5	3.3	0.04
viral entry into host cell	4	2.6	0.041
angiogenesis	6	3.9	0.041
regulation of protein localization to membrane	2	1.3	0.044
neural crest cell migration	3	2	0.048

差异蛋白富集到 22 个分子功能，包括钙粘蛋白结合、染色质的结构成分、蛋白质异二聚化活性、蛋白结合、丝氨酸型内肽酶抑制剂活性、白细胞介素-1 受体活性、氨基丁酸脱氢酶活性、金属氨肽酶活性、氨肽酶活性、病毒受体活性、脂肪酸结合、肌肉结构成分、肽酶活性、肌动蛋白结合、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (NAD +)（非磷酸化）活性、丝氨酸型肽酶活性、二肽酶活性、纽蛋白结合、催化活性、肌联蛋白结合、氧化还原酶活性。

差异蛋白富集到 10 个 KEGG 通路，包括志贺氏菌病、系统性红斑狼疮、酗酒、癌症中的转录失调、中性粒细胞胞外陷阱形成、代谢途径、beta-Alanine 新陈代谢、破骨细胞分化、细胞粘附分子、细胞因子-细胞因子受体相互作用。

11 个差异蛋白富集到酗酒。研究表明酒精和精神活性物质等滥用药物的影响存在相似之处，例如多巴胺能标志物减少[37]。

3 个差异蛋白富集到β-丙氨酸代谢这一通路。β-丙氨酸是一种神经调节物质。γ-氨基丁酸（GABA）和β-丙氨酸的四种环己烯类似物被设计为癫痫和药物成瘾药物氨己烯酸的构象刚性类似物，并作为γ-氨基丁酸转氨酶（GABA-AT）的潜在基于机制的灭活剂[48]。

4 个差异蛋白富集到骨矿化、破骨细胞增生等 BP。五个差异蛋白富集到破骨细胞分化这一 KEGG 通路。研究显示，在高比例的甲基苯丙胺滥用者中，骨矿物质的损失相当大[49]。

7 个差异蛋白富集到细胞因子-细胞因子受体相互作用。细胞因子平衡的变化与血脑屏障的损害有关，导致大脑可塑性的改变，产生持久的神经毒性[76]。

表 4 急性期患者与健康人之间差异蛋白富集到的 KEGG 通路

Term	Count	%	P-Value
Shigellosis	13	8.6	5.80E-06
Systemic lupus erythematosus	10	6.6	8.50E-06
Alcoholism	11	7.2	1.70E-05
Transcriptional misregulation in cancer	11	7.2	2.10E-05
Neutrophil extracellular trap formation	10	6.6	1.20E-04
Metabolic pathways	26	17.1	7.70E-03
beta-Alanine metabolism	3	2	3.80E-02
Osteoclast differentiation	5	3.3	4.00E-02
Cell adhesion molecules	5	3.3	7.30E-02
Cytokine-cytokine receptor interaction	7	4.6	7.80E-02

3.3 康复组与健康组比较分析

3.3.1 差异蛋白的 IPA 通路分析

健康组与康复期患者组的对比分析中，筛选出 312 个差异蛋白，筛选条件是 FC＞1.5 或＜0.67，P＜0.05。

差异蛋白富集到 62 个 IPA 通路。

显著性最大的通路是 FXR / RXR 激活、LXR / RXR 激活。苯丙胺（AMPH）诱导的运动活动的主要底物与多巴胺前脑回路有关。与 AMPH 诱导的运动活动相关的大脑区域表达高水平的类视黄醇受体（RXR），类视黄醇 X 受体参与苯丙胺诱导的运动活动[32]。

突触发生信号通路、轴突引导信号被富集到。甲基苯丙胺可导致哺乳动物前脑中多巴胺能神经末梢的破坏，影响神经元生长和突触形成[8,75]。

差异蛋白也富集到了许多与免疫相关的通路，如凝血、淋巴细胞信号、补体系统、类风湿性关节炎信号、系统性红斑狼疮信号等。

6 个差异蛋白富集到凝血，z-score 为 0.8。凝血酶原激活途径也被富集到。阿片类药物成瘾会导致凝血系统改变[50]。4 个差异蛋白富集到补体系统，z-score 为-1。补体系统参与了甲基苯丙胺成瘾[51]，合成精神活性药物滥用可能引发多种补体系统突变[52]。

三个差异蛋白富集到蔗糖降解。蔗糖摄入会激活中皮质边缘系统，其方式与滥用物质相近[53]。若干差异蛋白富集到糖酵解、糖异生相关通路。4 个差异蛋白富集到青少年发病的成人型糖尿病/成人起病的青少年糖尿病(MODY)信号传导。6 个差异蛋白富集到铁稳态信号通

路，5 个差异蛋白富集到铁死亡信号通路。甲基苯丙胺会引起一种毒性综合征，其特征是碳水化合物代谢改变、钙和铁稳态失调、氧化应激增加和线粒体功能破坏[40]。

差异蛋白富集到一些重要氨基酸的生物合成或降解过程，包括丙氨酸生物合成、丙氨酸降解、甘氨酸生物合成、色氨酸降解、蛋氨酸回收、酪氨酸合成。这些氨基酸的代谢情况可能与成瘾过程有关。

甘氨酸转运蛋白（GlyT）-1 在维持谷氨酸能突触的甘氨酸水平方面起着关键作用。Glycine 是 N-甲基-D-天冬氨酸（NMDA）受体的变构激动剂，而 NMDA 受体的激活是诱导甲基苯丙胺依赖和精神病的重要步骤[54]。甘氨酸可降低甲基苯丙胺诱导的运动活动[55]。

戒断甲基苯丙胺滥用者血浆代谢组中丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路、半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路发生显著变化[56]。

多巴胺能神经元深度参与成瘾，酪氨酸羟化酶催化多巴胺 （DA） 生物合成的第一步和限速步骤。酪氨酸羟化酶在多巴胺能神经元中的过表达增加了对甲基苯丙胺的敏感性。酪氨酸羟化酶可能是改善对滥用药物敏感性的药物靶点[57]。

Anandamide 降解这一通路被富集到。Anandamide，又名花生四烯酰乙醇酰胺，是第一个被发现的内源性大麻素。药物滥用会导致成瘾所涉及的大脑回路的突触可塑性受到破坏，正常内源性大麻素活性的改变起着重要作用。这促进了大脑的异常变化和物质使用障碍特征的成瘾行为的发展[58]。几项研究表明，Anandamide 对大脑奖励回路具有整体调节作用。一些报告表明，它参与了其他滥用药物的成瘾行为，并且还可以在药物滥用的动物模型中充当行为强化剂。Anandamide 的这些作用似乎都通过对其代谢降解的药理学抑制而得到增强，用脂肪酸酰胺水解酶抑制剂（负责其降解的主要酶）治疗后，Anandamide 的大脑水平升高，似乎会影响许多滥用药物的奖励和强化作用[59]。

许多信号转导相关的通路被富集到。

16 个差异蛋白富集到 p70S6K 信号。丝裂原刺激的 p70-S6 激酶（p70-S6K）参与大鼠对甲基苯丙胺诱导的奖励效应的致敏发展[60]。p70S6K 现在被认为是癌症等疾病的药物开发的新治疗靶点。

12 个差异蛋白富集到 IL-15 信号，7 个差异蛋白富集到 IL-15 产生。甲基苯丙胺（METH）成瘾和戒断对免疫系统和神经系统造成严重伤害,急性戒断甲基苯丙胺的患者的白细胞介素（IL）-1β、IL-9、IL-15 水平显著降低[61]。

5 个差异蛋白富集到 Ephrin B 信号，z-score 为-1.3。Ephrin 是轴突引导分子，可能与阿片类药物成瘾相关的行为有关[62]。Eph 受体 A4 在脱髓鞘和抑郁相关行为中发挥作用[63]。

10 个差异蛋白富集到网格蛋白（Clathrin）介导的内吞信号传导。多巴胺受体的内吞作用受许多成分的调节，如网格蛋白、β-抑制蛋白、小窝蛋白和 Rab 家族蛋白。多巴胺受体从溶酶体消化中逸出，其循环迅速发生，加强了多巴胺能信号转导[64]。

8 个差异蛋白富集到肌动蛋白细胞骨架的信号，z-score 为-0.4。文献显示肌动蛋白细胞骨架可作为预防甲基苯丙胺复发的治疗靶点[65]。甲基苯丙胺可降低紧密连接蛋白的表达，重新排列 F-肌动蛋白细胞骨架，并通过 RhoA/ROCK 依赖性途径增加血脑屏障通透性[66]。

9 个差异蛋白富集到精子的运动性。甲基苯丙胺通过钙信号通路相关蛋白起作用来影响细胞内钙稳态。此外，它可能通过 GABA A-α1 受体和钙结合蛋白破坏精子中的离子稳态，引发细胞内钙离子和氯离子的变化，与精子的运动性有关[67]。

5 个差异蛋白富集到巨胞饮（Macropinocytosis）信号。暴露于甲基苯丙胺期间 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞中，巨胞饮作用的过度刺激导致溶酶体功能障碍[68]。

17 个差异蛋白富集到磷脂酶 C 信号。研究表明，中枢肾素-血管紧张素系统与神经系统疾病有关。抑制 PLCβ1 有效缓解了甲基苯丙胺诱导的神经毒性和甲基苯丙胺的自我给药，通过中枢阻断 PLCβ1 涉及信号通路显著降低了甲基苯丙胺的强化和激励作用[69]。

6 个差异蛋白富集到 Th1、Th2 激活途径。可卡因使用障碍与 Th1/Th2/Th17 细胞因子和淋巴细胞亚群的变化有关[70]。

7 个差异蛋白富集到 RHOGDI 信号。Rho GDP 解离抑制剂（Rho GDP-dissociation inhibitor, Rho GDI）被确定为 Rho 家族 GTP 酶的下调调节剂[71]。Rho 激酶抑制剂可改善甲基苯丙胺诱导的精神分裂症雄性小鼠模型中的认知障碍[72]。

14 个差异蛋白富集到活化的 T 细胞核内因子（NFAT）在调节免疫反应的作用。甲基苯丙胺诱导钙调磷酸酶活化、NFAT 的核易位[73],钙调磷酸素/NFAT 诱导的 Fas 配体/Fas 死亡通路上调参与甲基苯丙胺诱导的神经元凋亡[74]。

此外，在康复期患者与健康人的对比分析中，发现有许多通路与急性期患者与健康人对比富集到的通路重合，重合的通路包括 LXR/RXR 激活、急性期反应信号传导、THOP1 在阿尔茨海默病中的神经保护作用、JAK 家族激酶在 IL-6 型细胞因子信号转导中的作用、肝纤维化/肝星状细胞活化、软骨细胞在类风湿性关节炎信号通路中的作用、PI3K/AKT 信号转导、STAT3 通路、色氨酸降解、左旋肉碱生物合成、LPS/IL-1 介导的 RXR 功能抑制、巨噬细胞、成纤维细胞和内皮细胞在类风湿性关节炎中的作用。如表格所示，“-”表示没有重复，是康复期患者独有的通路。其中许多通路与甲基苯丙胺、成瘾可能有相关性。

THOP1（thimet oligopeptidase 1）是一种酶，主要功能是降解神经肽和激素，如催产素和血管紧张素Ⅱ等，THOP1 在中枢神经系统的神经调节和免疫系统的调节中发挥了重要的作用，与阿尔茨海默病等许多疾病的发展和预后密切相关。甲基苯丙胺滥用可能导致阿尔茨海默病和神经退行性变的过早发展[35]。

长期甲基苯丙胺使用者血清 TNF-α、IL-6 和 IL-18 水平升高[27,26]。还有研究表明，TNF-α 和 IL-6 通过 IL-6 受体对甲基苯丙胺诱导的小胶质细胞死亡具有保护作用，特别是通过激活 JAK-STAT3 通路，从而改变促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白[28]。

甲基苯丙胺可以通过激活多巴胺/PI3K/AKT 信号通路来介导神经保护[36]。左旋肉碱可能能够通过在多巴胺释放或线粒体功能水平上的作用来发挥其对甲基苯丙胺毒性的神经保护作用[20]。

色氨酸代谢物是 5-羟色胺、褪黑激素、犬尿氨酸和喹啉通路的胺前体，其水平已被发现受甲基苯丙胺成瘾的影响[21]。犬尿氨酸途径是色氨酸降解的主要途径，研究发现在某些阶段调节犬尿氨酸代谢可以减少、预防或消除类似药物的寻求行为[22]。

甲基苯丙胺成瘾与多巴胺能系统紧密相关。多巴胺能系统强烈影响类风湿性关节炎的进展[24]。多巴胺可能参与骨形成、类风湿性关节炎的骨重塑和关节侵蚀[25]。

我们发现戒毒三个月以上的人的部分差异蛋白和通路（康复期患者与健康人之间的比较）与正在吸毒的人（急性期患者与健康人之间的比较）重合，这些一致性可能反映出，即便在戒断甲基苯丙胺三个月以上，患者身体中依旧留下了持久的影响，恢复不到健康人的水平，这些影响可能也是戒断甲基苯丙胺后的患者复吸率依旧很高的原因。但是，在戒断更长时间以后，甲基苯丙胺戒断患者也有可能恢复到健康人的水平。除了重合的通路，其他许多通路同样显示出与成瘾的相关性。这些差异蛋白和通路也许能够为药物成瘾的治疗提供潜在的药物靶点，为药物成瘾机制的探究提供线索，期待后续研究能进行进一步的探索。

表 5 康复期患者与健康人之间差异蛋白富集到的 IPA 通路（RH 表示康复期患者与健康人对比,AH 表示急性期患者与健康人对比）

Ingenuity Canonical Pathways	RH -log(p-value)	AH -log(p-value)	References
FXR/RXR Activation	12.4	-	[32]
LXR/RXR Activation	11.4	2.02	[32]
Acute Phase Response Signaling	11.3	2.09	

Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	5.17	2.16	[35]
Coagulation System	4.93	-	[50]
p70S6K Signaling	4.59	-	[60]
PI3K Signaling in B Lymphocytes	3.94	-	[36]
B Cell Development	3.9	-	
Role of JAK family kinases in IL-6-type Cytokine Signaling	3.83	2.74	[28, 27, 26]
Sucrose Degradation V (Mammalian)	3.76	-	[53]
IL-15 Signaling	3.74	-	[61]
FcγRIIB Signaling in B Lymphocytes	3.63	-	
IL-15 Production	3.36	-	[61]
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	3.24	1.4	[42]
Ephrin Receptor Signaling	3.05	-	[63, 62]
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	2.97	-	[64]
Systemic Lupus Erythematosus In B Cell Signaling Pathway	2.9	-	
Complement System	2.71	-	[52, 51]
Synaptogenesis Signaling Pathway	2.62	-	[8,75]
Axonal Guidance Signaling	2.52	-	[8,75]
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	2.5	-	[50]
B Cell Receptor Signaling	2.44	-	
Ephrin B Signaling	2.36	-	[63, 62]
Role Of Chondrocytes In Rheumatoid Arthritis Signaling Pathway	2.3	2.59	[25, 24]
Pathogen Induced Cytokine Storm Signaling Pathway	2.29	-	
Glycolysis I	2.28	-	[40]
Macropinocytosis Signaling	2.26	-	[68]
Gluconeogenesis I	2.23	-	[40]
SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	2.04	-	
Glycine Betaine Degradation	2.04	-	
PI3K/AKT Signaling	2.01	1.96	[36]
Sperm Motility	1.94	-	[67]
Iron homeostasis signaling pathway	1.85	-	[40]
STAT3 Pathway	1.8	1.88	[28]
Phospholipase C Signaling	1.75	-	[69]
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	1.65	-	
Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	1.64	-	[50]
Osteoarthritis Pathway	1.63	-	[25, 24]
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	1.6	-	[25, 24]
Actin Cytoskeleton Signaling	1.56	-	[66, 65]
VDR/RXR Activation	1.55	-	[32]
Maturity Onset Diabetes of Young (MODY) Signaling	1.55	-	[40]
Alanine Degradation III	1.53	-	[56]
Alanine Biosynthesis II	1.53	-	[56]
Glycine Biosynthesis I	1.53	-	[55, 54]
Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	1.5	3.58	[23, 22, 21]

Systemic Lupus Erythematosus Signaling	1.49	-	
Th1 and Th2 Activation Pathway	1.41	-	[70]
Ferroptosis Signaling Pathway	1.38	-	[40]
IL-6 Signaling	1.36	-	[28, 27, 26]
L-carnitine Biosynthesis	1.36	3.87	[20]
Guanine and Guanosine Salvage I	1.36	-	
Methionine Salvage II (Mammalian)	1.36	-	[56]
Anandamide Degradation	1.36	-	[59, 58]
Tyrosine Biosynthesis IV	1.36	-	[57]
RHOGDI Signaling	1.35	-	[72, 71]
Hepatic Fibrosis Signaling Pathway	1.34	-	[42]
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	1.34	-	
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	1.33	-	[74, 73]
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	1.32	2.41	[32, 31]
Th2 Pathway	1.31	-	[70]
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	1.31	1.68	[25, 24]

3.3.2 差异蛋白的 GO 分析和 KEGG 通路分析

差异蛋白富集到 83 个生物学过程（$p<0.05$），包括内肽酶活性的负调节、细胞粘附、轴突引导、多细胞生物发育、细胞迁移的积极调节、激酶活性的正向调节、突触组装的积极调节、碳水化合物代谢过程、蛋白水解、Ephrin 受体信号通路、补体激活，经典途径、细胞间粘附、受体介导的内吞作用、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、先天免疫反应、负趋化性、肽基-酪氨酸磷酸化、凝血、血管生成、纤维蛋白溶解的负调节、免疫应答、细胞外基质拆解的调控、轴突肌束震颤、糖苷分解代谢过程、诱导细菌凝集、免疫球蛋白生产、上皮细胞分化、视网膜稳态、病毒进入宿主细胞、炎症反应、神经嵴细胞迁移、纤溶酶原活化的负调节、细胞基质粘附、抗菌肽介导的抗菌体液免疫应答、果糖代谢过程、半胱氨酸型内肽酶活性的负调节、调节血液凝固、核苷酸代谢过程、纤溶酶原活化、适应性免疫应答、细胞铁离子稳态、糖胺聚糖分解代谢过程、对革兰氏阳性细菌的防御反应、甲状腺激素转运、对真菌的防御反应、凝血的负调节、树突棘发育、转化生长因子β受体信号通路、病毒进入宿主细胞的积极调节、白细胞介素-6 产生的正调节、蛋白质分解代谢过程、对缺氧的反应、急性期反应、肿瘤坏死因子产生的正向调节、磷脂稳态、细胞迁移、钙依赖性细胞间通过质膜细胞粘附分子粘附、细胞间信号传导、平滑肌细胞-基质粘附、糖脂分解代谢过程、铁离子稳态、基质粘附依赖性细胞扩散的正向调节、视网膜神经节细胞轴突引导、细胞因子介导的信号通路、铁离子传输、中性粒细胞趋化性、吞噬作用的积极调节、血管生成的正向调节、补体依赖性细胞毒性、参与细胞运动的基于细胞质肌动蛋白的收缩、酶原活化、髓鞘形成、溶酶体组织等。IPA 通路分析的结果与利用 DAVID 数据库进行 GO 分析的结果有部分重合，能够互相验证，互相补充。

差异蛋白富集到的生物学过程中中包括许多神经调节相关生物学过程，例如，轴突引导、突触组装、神经棘细胞迁移、神经元发育、树突棘发育、髓鞘形成等。也包括许多与免疫相关的生物学过程，例如，补体激活、先天免疫反应、免疫应答、免疫球蛋白生产、炎症反应等。甲基苯丙胺具有调节免疫细胞的能力[76]，对大脑、免疫、消化都有重大影响[77]。

在康复期患者与健康人的对比分析中，发现有许多生物学过程与急性期患者与健康人对比富集到的生物学过程重合，重合的生物学过程包括内肽酶活性负调控、细胞粘附、突触组

装的正调控、蛋白水解、通过质膜细胞粘附分子的异嗜性细胞间粘附、通过质膜粘附分子的同嗜性细胞粘附、血管生成、病毒进入宿主细胞、神经嵴细胞迁移。许多生物学过程可能与成瘾有关。

17 个差异蛋白富集到内肽酶活性的调节。许多内肽酶能够调节神经肽、脑啡肽的降解，脑啡肽与情绪、焦虑、奖励、欣快感和疼痛的调节有关[78]。差异蛋白中，羧肽酶 E（CPE）（FC=0.55,P=0.02）调节多巴胺转运蛋白活性[79]。

13 个差异蛋白富集到血管生成。视网膜稳态、视网膜神经节细胞轴突引导等生物学过程也被富集到。甲基苯丙胺给药可诱导视网膜缺氧和血管生成[47]。

7 个差异蛋白富集到 Ephrin 受体信号通路。许多轴突引导分子，如整合素、信号素和 Ephrin，可能通过改变轴突-靶标连接和突触发生来促进羟考酮诱导的神经适应，这可能与阿片类药物成瘾相关的行为有关[62]。Eph 受体 A4 在脱髓鞘和抑郁相关行为中发挥作用[63]。

10 个差异蛋白富集到跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路。受体酪氨酸激酶（RTK）是一大类蛋白质，在神经系统中可以通过调节神经元和神经胶质功能来调节行为，因此，它们与神经退行性疾病和抑郁症、成瘾等精神疾病有关。多种受体酪氨酸激酶调节饮酒和其他与酒精成瘾相关的行为。受体酪氨酸激酶是开发治疗酒精使用障碍（AUD）的药物靶点[80]。

表 6 康复期患者与健康人之间的差异蛋白富集到的生物学过程（BP）

Term	Count	%	P-Value
negative regulation of endopeptidase activity	17	5.4	1.40E-09
cell adhesion	31	9.9	5.10E-09
axon guidance	16	5.1	2.40E-07
multicellular organism development	17	5.4	3.90E-07
positive regulation of cell migration	18	5.8	1.10E-06
positive regulation of kinase activity	10	3.2	2.20E-06
positive regulation of synapse assembly	8	2.6	5.40E-05
carbohydrate metabolic process	12	3.8	9.60E-05
proteolysis	19	6.1	1.30E-04
ephrin receptor signaling pathway	7	2.2	1.50E-04
complement activation, classical pathway	10	3.2	1.60E-04
heterophilic cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	7	2.2	1.70E-04
receptor-mediated endocytosis	8	2.6	2.30E-04
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	10	3.2	2.70E-04
innate immune response	23	7.4	2.70E-04
negative chemotaxis	6	1.9	3.60E-04
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	11	3.5	4.30E-04
peptidyl-tyrosine phosphorylation	10	3.2	4.60E-04
blood coagulation	8	2.6	4.90E-04
angiogenesis	13	4.2	7.40E-04
positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	8	2.6	7.80E-04
negative regulation of fibrinolysis	4	1.3	1.00E-03
negative regulation of cell adhesion	6	1.9	1.40E-03
immune response	18	5.8	2.30E-03
regulation of extracellular matrix disassembly	3	1	2.40E-03
axonal fasciculation	4	1.3	3.20E-03

fibrinolysis	4	1.3	3.20E-03
glycoside catabolic process	3	1	3.60E-03
induction of bacterial agglutination	3	1	3.60E-03
immunoglobulin production	7	2.2	3.80E-03
epithelial cell differentiation	7	2.2	3.80E-03
retina homeostasis	5	1.6	3.90E-03
viral entry into host cell	7	2.2	5.70E-03
inflammatory response	15	4.8	6.40E-03
neural crest cell migration	5	1.6	6.40E-03
opsonization	3	1	6.60E-03
negative regulation of plasminogen activation	3	1	6.60E-03
cell-matrix adhesion	7	2.2	7.10E-03
antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	7	2.2	7.80E-03
ovulation cycle	3	1	8.40E-03
fructose metabolic process	3	1	1.00E-02
negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity	3	1	1.00E-02
regulation of blood coagulation	3	1	1.20E-02
nucleotide metabolic process	3	1	1.20E-02
plasminogen activation	3	1	1.20E-02
central nervous system projection neuron axonogenesis	3	1	1.20E-02
adaptive immune response	15	4.8	1.30E-02
cellular iron ion homeostasis	5	1.6	1.30E-02
glycosaminoglycan catabolic process	3	1	1.50E-02
defense response to Gram-positive bacterium	7	2.2	1.70E-02
thyroid hormone transport	3	1	1.70E-02
defense response to fungus	4	1.3	1.80E-02
negative regulation of blood coagulation	3	1	2.00E-02
dendritic spine development	3	1	2.00E-02
transforming growth factor beta receptor signaling pathway	6	1.9	2.20E-02
positive regulation of viral entry into host cell	3	1	2.30E-02
cell-cell junction assembly	4	1.3	2.40E-02
positive regulation of interleukin-6 production	6	1.9	2.50E-02
protein catabolic process	5	1.6	2.50E-02
response to hypoxia	8	2.6	2.70E-02
acute-phase response	4	1.3	2.90E-02
positive regulation of tumor necrosis factor production	6	1.9	2.90E-02
phospholipid homeostasis	3	1	2.90E-02
cell migration	10	3.2	2.90E-02
calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	4	1.3	3.00E-02
cell-cell signaling	9	2.9	3.10E-02
smooth muscle cell-matrix adhesion	2	0.6	3.10E-02
glycolipid catabolic process	2	0.6	3.10E-02
iron ion homeostasis	4	1.3	3.20E-02
positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading	4	1.3	3.20E-02

cell-cell adhesion	8	2.6	3.30E-02
retinal ganglion cell axon guidance	3	1	3.60E-02
cytokine-mediated signaling pathway	7	2.2	3.80E-02
iron ion transport	3	1	3.90E-02
neutrophil chemotaxis	5	1.6	4.10E-02
positive regulation of phagocytosis	4	1.3	4.50E-02
positive regulation of angiogenesis	7	2.2	4.70E-02
oviduct epithelium development	2	0.6	4.70E-02
complement-dependent cytotoxicity	2	0.6	4.70E-02
cytoplasmic actin-based contraction involved in cell motility	2	0.6	4.70E-02
zymogen activation	3	1	4.70E-02
myelination	4	1.3	4.70E-02
lysosome organization	4	1.3	4.90E-02

差异蛋白富集到 11 个 KEGG 通路，包括补体和凝血级联反应、百日咳、溶酶体、唾液分泌、轴突引导、造血细胞系、病毒-疱疹病毒、细胞因子-细胞因子受体相互作用、金黄色葡萄球菌感染、糖酵解/糖异生、其他聚糖降解。

12 个差异蛋白富集到补体和凝血级联反应。补体系统参与了甲基苯丙胺成瘾，补体因子 H（CFH）在冰毒成瘾患者和大鼠的血清以及大鼠的某些大脑区域中上调[51]，合成精神活性药物滥用可能引发多种补体系统突变[52]。阿片类药物成瘾会导致凝血系统改变[50]。

13 个差异蛋白富集到细胞因子-细胞因子受体相互作用。细胞因子平衡的变化与血脑屏障的损害有关，导致大脑可塑性的改变，产生持久的神经毒性[76]。另外，11 个差异蛋白富集到轴突引导。

表 7 康复期患者与健康人之间差异蛋白富集到的 KEGG 通路

Term	Count	%	P-Value
Complement and coagulation cascades	12	3.8	8.70E-07
Pertussis	9	2.8	1.20E-04
Lysosome	11	3.5	2.70E-04
Salivary secretion	8	2.5	2.40E-03
Axon guidance	11	3.5	3.20E-03
Hematopoietic cell lineage	8	2.5	3.40E-03
Virion - Herpesvirus	3	0.9	1.30E-02
Cytokine-cytokine receptor interaction	13	4.1	1.40E-02
Staphylococcus aureus infection	6	1.9	4.10E-02
Glycolysis / Gluconeogenesis	5	1.6	4.30E-02
Other glycan degradation	3	0.9	4.80E-02

3.4 急性组与康复组成组比较分析

急性期患者与康复期患者组的对比分析中，筛选出 200 个差异蛋白，筛选条件是 FC＞1.5 或＜0.67，P＜0.05。

利用 DAVID 数据库对差异蛋白进行功能分析，共富集到 57 个生物学过程（BP），包括免疫球蛋白生产、免疫应答、细胞间粘附、细胞粘附、非规范 Wnt 信号通路、适应性免疫应答、突触膜粘附、细胞对氨基酸刺激的反应、大分子复合物组装、突触前组装的调节、细胞迁移、受体介导的内吞作用、调节细胞-基质粘附、细胞生长的调节、骨化、肌母细胞融合的积极

调节、凝血、内肽酶活性的负调节、细胞凋亡过程的正向调节、白三烯 D4 分解代谢过程、底物粘附依赖性细胞扩散、脂蛋白代谢过程、白细胞介素-6 产生的正调节、倒刺端肌动蛋白丝封盖、蛋白质定位到质膜、蛋白水解、细胞外基质组织、内胚层细胞分化、纤维蛋白溶解的调节、TGFβ 在细胞外基质中的螯合、角质形成细胞凋亡过程的正向调节、神经元投影开发、细胞增殖的负调节、信号转导、组织发育、骨骼系统开发、动物器官形态发生、炎症反应、神经系统发育、内吞作用、肌动蛋白丝聚合、急性期反应、多细胞生物发育、高密度脂蛋白颗粒清除、细胞因子介导的信号通路、典型 Wnt 信号通路、吞噬作用的积极调节、Wnt 信号通路的负调控、抗菌肽介导的抗菌体液免疫应答、原肠胚形成的调节等。

差异蛋白富集到 27 个分子功能（MF），包括钙离子结合、细胞外基质结构成分、信号受体活性、NAD+ 核苷酸酶，环 ADP 核糖生成、NAD(P)+ 核糖核酸酶活性、碳水化合物结合、酶结合、白细胞介素-1 受体活性、脂质转运蛋白活性、抗原结合、Wnt 蛋白结合、NF-κB 结合、补体成分 C3b 结合、赋予抗张强度的细胞外基质结构成分、跨膜受体蛋白酪氨酸磷酸酶活性、辅助受体活性、生物素酶活性、核心启动子近端区域序列特异性 DNA 结合、激素活性、甘露糖结合、参与细胞间粘附的蛋白结合、细胞粘附分子结合、肝素结合、翻译延伸因子活性、跨膜信号受体活性、病毒受体活性。

差异蛋白富集到 6 个 KEGG 通路，包括补体和凝血级联反应、细胞因子-细胞因子受体相互作用、细胞粘附分子、ECM-受体相互作用、造血细胞系、阿米巴病。

差异蛋白富集到 56 个 IPA 通路，包括肝纤维化/肝星状细胞活化、LXR/RXR 激活、B 细胞发育、急性期反应信号传导、B 淋巴细胞中的 PI3K 信号转导、病原体诱导的细胞因子风暴信号通路、破骨细胞在类风湿性关节炎信号通路中的作用、FXR/RXR 活化、IL-15 信号转导、p70S6K 信号转导、成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞在类风湿性关节炎中的作用、B 淋巴细胞中的 FcγRIIB 信号传导、凝血系统、软骨细胞在类风湿性关节炎信号通路中的作用、骨关节炎途径、B 细胞信号通路中的系统性红斑狼疮、伤口愈合信号通路、网格蛋白（Clathrin）介导的内吞信号传导、巨噬细胞、成纤维细胞和内皮细胞在类风湿性关节炎中的作用、B 细胞受体信号传导、IL-10 信号转导、神经肌肉接头的 Agrin 相互作用、THOP1 在阿尔茨海默病中的神经保护作用、系统性红斑狼疮信号传导、补体系统、先天和适应性免疫细胞之间的通讯、类风湿关节炎中 T 细胞和 B 细胞信号传导的改变、WNT/β-catenin 信号传导、JAK 家族激酶在 IL-6 型细胞因子信号转导中的作用、GP6 信号通路、白三烯生物合成、NFAT 在免疫应答调节中的作用、肺纤维化特发性信号通路、PPAR 信号传导、成骨细胞在类风湿性关节炎信号通路中的作用、粒细胞粘附和渗出、髓鞘形成信号通路、动脉粥样硬化信号传导、IL-6 信号转导、VDR/RXR 激活、青少年发病的成人型糖尿病 / 成人起病的青少年糖尿病 (MODY) 信号传导、STAT3 通路、肺愈合信号通路、嘧啶核糖核苷酸相互转化、磷脂酶 C 信号传导。

3.5 综合分析与讨论

除了成组比较分析以外，我们还使用了一对多分析方法，将每个急性期患者样本与一组年龄、性别比例基本对应的健康人样本进行比较分析，找出每个急性期患者共有的差异蛋白，以期寻找与成瘾有关的生物标志物和通路信息。筛选条件是，FC＞1.5 或＜0.67，P＜0.05。

在所有急性期患者中共有的差异蛋白是两性蛋白诱导蛋白 1 (Amphoterin-induced gene and ORF 1, AMIGO-1)。AMIGO-1 在多种脑细胞类型中表达，可能调节树突状生长和神经元存活，可能在成人神经系统的再生和神经可塑性中起作用[81]，而神经可塑性与成瘾过程紧密相关。

在三组样本两两比较中，AMIGO-1 也被筛选为差异蛋白，AMIGO-1 在三组样本中鉴定情况如下：急性期组均为 0，康复期组平均值为 149，健康组平均值为 1255。笔者推测尿液蛋白质组中 AMIGO-1 的含量有可能与甲基苯丙胺的使用呈现负相关关系，甲基苯丙胺的使用可

能会导致尿液蛋白质组中 AMIGO-1 含量减少，经过戒断、康复后，尿液蛋白质组中 AMIGO-1 含量又有所升高。AMIGO-1 可能有潜力作为甲基苯丙胺使用的生物标志物。

值得一提的是，我们发现戒毒三个月以上的人的部分差异蛋白和通路（康复期患者与健康人之间的比较）与正在吸毒的人（急性期患者与健康人之间的比较）重合，这些一致性可能反映出，即便在戒断甲基苯丙胺三个月甚至更长时间以上，患者身体中依旧留下了持久的影响，恢复不到健康人的水平，这些影响可能也是戒断甲基苯丙胺后的患者复吸率依旧很高的原因。除了重合的通路，其他许多通路同样显示出与成瘾的相关性。这些差异蛋白和通路也许能够为药物成瘾的治疗提供潜在的药物靶点，为药物成瘾机制的探究提供线索，期待后续研究能进行进一步的探索。

此外，在分析过程中，康复期组患者与健康人比较筛选得到的差异蛋白和通路比急性期组患者多，差异性更加显著。分析原因可能如下：甲基苯丙胺短时间内就能对机体产生极大影响，生理指标会随时间剧烈波动，不同剂量的药物、不同药物使用时间、不同代谢状态影响下人体的反应可能都不同，而尿液是一个窗口，对于机体短时间内状态变化的反映十分敏感。另外，人类对成瘾的易感性存在很大差异[82]。因此，在急性停止使用甲基苯丙胺 24 小时内的急性期患者的样本的异质性相对较高。本研究结果可能有利于之后细化实验设计，将样本分组得更细，保证组内差异性小，能够更好地找到共同点。

总而言之，本研究对比分析了甲基苯丙胺使用患者（停止使用甲基苯丙胺 24 小时以内的患者）、甲基苯丙胺戒断患者（停止使用毒品 3 个月以上的、进入康复期治疗的患者）、健康人的尿液蛋白质组，甲基苯丙胺滥用患者的尿液蛋白质组与健康人之间显著不同，部分差异蛋白及其富集到的生物学功能显示与成瘾或甲基苯丙胺的神经毒性有关。本研究创新性地建立了一个从尿液蛋白质组学角度研究成瘾性药物的方法，证明了尿液蛋白质组能够较为系统、全面地反映甲基苯丙胺滥用对机体产生的影响，有潜力为临床成瘾性疾病的研究和实践提供线索。

4 展望

本研究对于理解甲基苯丙胺成瘾的机制和生物学基础具有重要意义。通过分析甲基苯丙胺成瘾患者尿液蛋白质组的变化，我们可以识别出与成瘾相关的蛋白质生物标志物，为甲基苯丙胺成瘾的早期诊断和治疗提供新的线索和方法。此外，通过深入研究甲基苯丙胺成瘾对机体的影响，我们可以揭示成瘾机制的一些重要细节，有助于制定更有效的预防和治疗策略。

同时，本研究为成瘾性药物的研究提供了全新的尿液蛋白质组的视角，提供了行之有效的研究方法和分析策略。尿液具有敏感度高、采集无创、样本稳定等优势，有望成为研究成瘾性物质的重要工具之一。

尽管本研究具有重要的意义和潜力，但也存在一些改进的空间。后续研究可以将本研究结果与临床数据相结合，进一步验证甲基苯丙胺成瘾患者尿液蛋白质组的具有临床应用价值。通过大样本的临床研究，我们可以评估这些蛋白质标志物的敏感性、特异性和预测价值，为甲基苯丙胺成瘾的早期诊断和治疗提供可靠的生物标志物。

最后，本研究的结果还可以为甲基苯丙胺成瘾的干预和治疗策略的开发提供指导。通过深入了解甲基苯丙胺成瘾对机体的影响，我们可以针对性地设计干预措施，以减少成瘾行为和缓解成瘾相关的生理和心理问题。进一步的研究可以探索不同干预方法的效果，并寻找更有效和个体化的治疗方案。

总之，本研究对于揭示甲基苯丙胺成瘾的机制、寻找生物标志物、指导临床诊断和治疗具有重要意义。同时，本研究还为后续实验和临床研究提供了启发，促进了对甲基苯丙胺成瘾的深入理解和有效管理。